临床研究

造血和淋巴系统实体肿瘤染色体标本制作与分析

薛 军
临汾市人民医院病理科,山西 临汾 041000

摘要:目的 总结人体造血和淋巴系统实体肿瘤细胞的培养及染色体制备的方法和成功率。**方法** 采用经过添加特定成分的RPMI1640培养基对2014~2016年的400例造血系统实体肿瘤和600例淋巴系统实体肿瘤标本进行细胞培养及染色体制备,每份标本经过常规低渗、预固定、固定到最后的滴片处理,G显带后在Applied imaging染色体核型自动分析系统上观察处理所得铺展分散良好、长短适中的分裂象的数量和比例。**结果** 400例造血系统实体肿瘤标本中有392例培养成功,8000个分裂象中铺展分散良好、长短适中的为5790个(占72.38%),分散不良但不影响分析结果的为2050个(占25.63%),分散差,无法分析的为120个(占1.5%);600例淋巴系统实体肿瘤中有595例培养成功,12000个分裂象中铺展分散良好、长短适中的为9554个(占79.62%),分散不良但不影响分析结果的为2346个(占19.55%),分散差,无法分析的为100个(占0.83%)。**结论** 本室针对造血和淋巴系统实体肿瘤标本制备的染色体质量佳,能收获到较多的铺展分散良好、长短适中的分裂象,有利于异常染色体的检出,能满足临床染色体核型分析的需要。

关键词:实体肿瘤;染色体;核型分析;培养

肿瘤细胞染色体核型分析是研究癌变机制和癌细胞生物学特性的极好材料,但实体肿瘤染色体标本制作比较困难,操作繁琐,收获时间长,任何一个步骤操作不当,均可影响染色体标本制备的最终效果[1]。因此各类肿瘤组织目前还难以用同一种方法去处理[2]。尽管如此,还是有一些学者致力于实体肿瘤的染色体研究,这是因为:研究患者外周血培养细胞主要是说明全身染色体状况,包括是否有全身染色体不稳定性等,而不能说明肿瘤本身的染色体改变。从建成的瘤细胞系或经过较长时期培养的瘤细胞固然比较容易获得可分析的染色体标本,但都存在着克隆演化或者选择生长的问题。只有从瘤组织本身或经过短期培养的组织获得的资料才能比较准确的反应肿瘤的实际情况。本实验室对造血和淋巴系统肿瘤经过长期实践和反复研究,参考外周血淋巴细胞和骨髓细胞染色体培养的方法,对培养的每个步骤都实行严格的标准化操作和改进,取得良好的效果,现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 材料

2014~2016年间我院肿瘤科、血液科等手术或活检的要求做核型分析的造血和淋巴系统实体瘤组织。体积较大的肿瘤组织中央常有退变或坏死区,取材时应去掉坏死组织,挑选瘤细胞集中和细胞活性较好的部位。

1.2 方法

1.2.1 *瘤细胞分离与培养* 无菌条件下取手术切除或活检得到的肿瘤组织,置于含有200 mmol/L谷氨酰胺、抗生素、制霉菌素的RPMI 1640培养基中,然后用手术刀将其反复剁碎并轻轻研磨成糊状,用尼龙网除去组织残屑,离心500 r/min,10 min,收集单个细胞,用无钙、镁的Hanks液将细胞洗2遍[3]后接种于含25%小牛血清的RPMI 1640培养基中,每例标本接种2瓶,每瓶接种0.3~0.5 mL标本。置温度为37 ±0.5 ℃,CO_2浓度为5%的培养箱内培养48~72 h。收获细胞前1 h,用1 mL移液管加入30 μg/mL秋水仙素0.5 mL 。摇匀后继续培养1 h。

1.2.2 *收获细胞* (1)取出培养瓶:将培养的细胞移入10 mL刻度离心管中,标记姓名、编号,以1200 r/min,离心10 min后弃上清,留下沉淀物;(2)低渗处理:用震荡仪将沉淀物抖散成悬浮液,向离心管中加入0.075 mol/L的KCL低渗液10 mL(预温至37 ℃),用吸管轻轻吹打,使细胞均匀悬浮于低渗液中,放回37 ℃恒温水浴箱中静置30 min,使细胞膨胀、解体,染色体分散[4];(3)预固定:沿管壁向离心管中加入新配置的固定液(甲醇:冰醋酸=3∶1[5])1 mL,上下颠倒数次混匀,在室温下放置10 min;(4)固定:以1200 r/min,离心10 min后弃上清,留下沉淀物。用震荡仪将沉淀物抖散成悬浮液,沿离心管壁加入新配固定液10 mL,上下颠倒数次混匀,室温放置30 min;(5)再固定:重复步骤4,加盖拧紧4 ℃冰箱贮存。

1.2.3 *制片、显带和染色* (1)制片:以1200 r/min,离心10 min后弃上清,加入新配制的固定液1 mL,用吸管轻轻吹打细胞团,制成细胞悬液,吸取2~4滴细胞悬液滴于湿的预冷的洁净载玻片上,每人制1片,标记姓名及编号,然后将玻片置于鼓风干燥箱(75 ℃)内2~3 h,取出

收稿日期:2016-03-28
作者简介:薛 军,技师,本科,E-mail: xj880412@163.com

后自然冷却至室温;(2)显带:在50 mL ddH$_2$O中加入2.5 mL浓度为0.25%的胰酶溶液,用3%Tris液3~5滴调整pH=6.8~7.0,在37 ℃恒温水浴箱中预热30 min,将玻片放入胰蛋白酶溶液中消化3 min;(3)染色:将消化过的染色体标本片立即放入3%小牛血清中上下提拉数次以终止消化,ddH$_2$O轻轻冲洗3次,然后置于10% Giemsa染色液中染色5 min;自来水轻轻冲洗1 min,晾干;(4)核型分析:显微镜下常规计数15~20个分裂相,分析3个G带核型(异常者分析5个)。如遇到嵌合体加倍计数和分析[6]。

2 结果

培养的400例造血系统实体肿瘤标本中有392例培养成功,共制备400张玻片,每张玻片观察20个分裂象,计算铺展分散良好的百分率。结果显示:制备的8000个分裂象中铺展分散良好、长短适中的为5790个(占72.38%),分散不良但不影响分析结果的为2050个(占25.63%),分散差,无法分析的为120个(占1.5%)。培养的600例淋巴系统实体肿瘤标本中有595例培养成功,共制备600张玻片,12000个分裂象中铺展分散良好、长短适中的为9554个(占79.62%),分散不良但不影响分析结果的为2346个(占19.55%),分散差,无法分析的为100个(占0.83%),获得的染色体铺展分散良好、长短适中,有利于异常染色体的检出,值得临床借鉴和推广。

3 讨论

近年来,由于医学的快速发展和人们生活水平的逐步提高,医学模式正从传统医疗向精准医疗过渡,染色体核型分析的重要性不言而喻。而实体肿瘤细胞染色体培养是一个复杂且繁琐的过程,临床工作中常需1~2周才能正常完成,而实验过程稍有不慎就有可能导致整个实验的失败。因此,除了对培养的每个步骤都实行严格的标准化操作外,为确保染色体制备质量,还需注意以下细节:(1)所选组织必须为肿瘤组织,最大限度保留组织的活性成分,严格无菌操作;(2)器皿洗涤一定要干净,不能有酸碱残留。否则会影响培养效果[7];(3)接种细胞量不能太多或太少。过多,细胞数目过多,营养不足,细胞易死亡。过少则染色体数量不足,达不到诊断依据;(4)培养细胞温度37±0.5 ℃。温度过高或过低都不利于细胞生长;(5)秋水仙素一定要避光保存,配制后使用期不能超过半年,低渗的时间、温度会影响染色体的分散和分裂相的数目;(6)离心机最好使用水平式,转速过快或过慢直接影响标本制片的质量;(7)固定液一定要现用现配,固定要彻底,加固定液不能过快,要沿管壁慢慢加入,否则染色体容易扭转,出现飘带样染色体;固定作用不足,染色体易出现毛刷状;(8)玻片的清洁度、冷冻温度及干湿程度都会影响染色体的铺展;(9)胰酶的品质会直接影响显带的质量,购买品牌试剂较保险,胰酶的活性与PH值和温度有关,在pH=7.0温度37 ℃状态下,胰酶活性最高。胰酶处理时间长短与标本片龄有关,新鲜的标本处理时间短,且带纹较清晰,建议标本的片龄在2~7 d内较适宜[8];(10)消化最适合的片龄是2~5 d[9],一般规律是标本存放时间越长,所需胰酶处理时间液越长。若烤好的片立即消化染色,就会出现标本太新鲜,染色体会出现毛绒样,与韩晶[10]报道的一致,片龄很长的标本,往往会导致斑点状染色体[11];(11)Giemsa工作液要现用现配。

参考文献:

[1] 张颖珍. 人体外周血染色体G显带制备时的影响因素及补救措施[J]. 中国优生优育, 2010, 16(5): 265-7.

[2] 刘权章. 人类染色体方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 268-72.

[3] 张卓然. 实用细胞培养技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 75-6.

[4] 蔡绍京. 细胞生物学与医学遗传学实验指南[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2002: 47-8.

[5] D. L斯佩克特, R.D.戈德曼, L.A. 莱因万德. 细胞生物学指南[M]. 北京:科学出版社, 2002: 1067-8.

[6] 吴 刚, 伦玉兰. 中国优生科学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2000: 835-40.

[7] 高锦声, 郑斯英, 陈嘉政, 等. 人类染色体方法学手册(修订本) [M]. 江苏: 江苏省医学情报研究所, 1981.

[8] 关 晶, 田现书, 耿进妹. 人体外周血淋巴细胞培养和染色体标本制备的几点体会[J]. 济宁医学院学报, 2003, 26(4): 33-8.

[9] 黄江玲, 林祥伟, 邱少雄, 等. 人体染色体标本制备方法及成功率[J]. 中国校医, 2015, 29(4): 526-7.

[10] 韩 晶, 李 洋. 外周血淋巴细胞培养及制备染色体G显带的技术研究[J].中国实验诊断学, 2011, 15(7): 1177-8.

[11] Hara M, Matsuzaki Y, shimizu T, et al. Preoperative preipheral nayve/memory ratio and prognosis of nonsmall-cell lung Cancer patients[J]. Ann thorac cardi ovase Surg, 2007, 13(6): 384-90.